استفاده از اسانس گل میخک (*Eugenia caryophillata*) بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن برای القا بیهوشی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

علی خسروانی‌زاده[1]؛ مصطفی غفاری*[2]؛ مصطفی خواجه[3]؛ بهروز ابطحی [4]؛ حسن صالحی[5]؛ اسحاق زکی‌پور رحیم‌آبادی[6] و خلیل احمدی پور نظام آبادی[7]

mostafaghaffari1@yahoo.com

١، ٦ و٧- دانشکده منابع طبیعی دانشگاه زابل، صندوق پستی: ٥٣٨-٩٨٦١٥

٢- پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون دانشگاه زابل، صندوق پستی: ٥٣٨-٩٨٦١٥

٣- دانشکده علوم دانشگاه زابل، صندوق پستی: ٥٣٨- ٩٨٦١٥

٤-دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی، تهران صندوق پستی: ٣١١٣-١٩٨٣٩٦

٥- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ٦١١٦-١٤١٥٥

تاریخ دریافت: دی ١٣٨٩ تاریخ پذیرش: آذر ١٣٩٠

چکیده

در تحقیق حاضر ٥٠ عدد ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین (± انحراف معیار) وزن ٢٤±١٥٥/٨ گرم و میانگین (± انحراف معیار) طول ٢±٢٣/٧ سانتیمتر در سیستم مدار بسته پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون دانشگاه زابل با غلظت‌های ١٠٠، ٧٥، ٥٠، ٢٥ و ppm ١٠ اسانس گل میخک (*Eugenia caryophillata*) بارگذاری شده روی نانو ذرات آهن به شیوه حمام بیهوش شدند. زمانهای رسیدن به مراحل تسکین، از دست دادن تعادل، بیهوشی سبک، بازگشت تعادل و احیاء کامل هر یک از ماهیان اندازه‌گیری و ثبت شد. نتایج نشان دادند که هر چه غلظت ماده بیهوش‌کننده کمتر شود، ایجاد بیهوشی آهسته‌تر و بازگشت از آن سریع‌تر اتفاق می‌افتد. حداقل مقدار مورد نیاز برای القا بیهوشی در این گونه با استفاده از اسانس گل میخک بار شده بر نانو ذرات آهن ppm ١٠ تعیین شد که بطور میانگین پس از ٢/١٦ دقیقه بیهوشی را القا کرد و بازگشت از آن بطور میانگین ٤/٦٥ دقیقه بطول انجامید. مقایسه نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج بدست آمده توسط دیگر محققین در مورد استفاده از اسانس گل میخک روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نشان می‌دهد بارگذاری اسانس گل میخک روی نانو ذرات آهن قدرت بیهوش‌کنندگی آن را تا ٢٥ برابر افزایش می‌دهد.

لغات کلیدی: بیهوشی، قزل‌آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، نانو تکنولوژی

*نویسنده مسئول

مقدمه

یکی از روش‌های مهم ایجاد بیهوشی و آرام بخشی در ماهیان غوطه‌وری است. تاکنون از داروهای گوناگونی بعنوان بیهوش کننده ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در صنعت آبزی‌پروری استفاده شده که از آن جمله می‌توان تری کائین متان سولفونات (Tricaine methane sulphonate) یا MS_{222} (Cammano Tubio *et el.,* 2010)، بنزوکائین (Benzocaine) (Cotter & Rodnick, 2006)، ایزو اوژنول (Isoeugenol) یا AQUI-S (Meinertz *et al.,* 2006)، ۲- فنوکسی اتانول (2-Phenoxyethanol) (Velisek & Svobodova, 2004)، اتومیدیت (Etomidate) (Kazun & Siwicki, 2001)، پیسکائین (Piscaine) (Kikuchi *et al.,* 1974)، پروپاندید (Propanidid) (Siwicki, 1984)، ترتیاری آمیل الکل (Tertiary amyl alcohol (TAA)) (Hilton & Dixon, 1982)، اسانس آویشن شیرازی (شریف روحانی و همکاران، ۱۳۸۶) اشاره کرد.

در سالهای اخیر اسانس گل میخک (Clove oil) بدلیل ایجاد بیهوشی در غلظت‌های پایین، ایجاد و بازگشت از بیهوشی بصورت آرام و بدون هیجان، عدم تلفات و رفتارهای غیرطبیعی پس از بازگشت از بیهوشی در آبزیان، قیمت ارزان نسبت به بیهوش کننده‌هایی نظیر MS_{222}، دسترسی آسان، دفع سریع از بدن، عدم سمیت مقادیر مصرفی، سازگاری با محیط زیست، عدم تحرک و شلی عضلات، عدم سمیت برای مصرف کننده انسانی و ..... مورد توجه قرار گرفته (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۳؛ شریف‌پور و همکاران، ۱۳۸۱) و در مطالعات گوناگون از آن برای بیهوشی قزل‌آلای رنگین کمان استفاده شده است (چیت‌ساز، ۱۳۷۹؛ ساطانی و همکاران، ۱۳۸۰؛ ابطحی و همکاران، ۱۳۸۱؛ Guenette *et al.,* 2007 ;Cotter & Rodnick, 2006 Velisek *et al.,* 2005; Woolsey *et al.,* 2004; Prihonen & Schreck, 2003; Wagner *et al.,* 2002; Prince & Powell, 2000; Keene *et al.,* 1998 Anderson *et al.,* 1997).

تهیه نانو ذرات بعنوان حاملین دارو، یکی از زمینه‌های پژوهشی مورد توجه در سامانه‌های دارورسانی می‌باشد (دوستگانی و همکاران، ۱۳۸۶). استفاده از نانو تکنولوژی در امر دارورسانی باعث افزایش قدرت عملکرد دارو و کاهش اثرات جانبی آن می‌گردد و بنحو شایسته‌ای به عضو هدف رسیده و اثر خود را اعمال می‌کند (رفیعی‌تبار، ۱۳۸۴).

با توجه به مزایای برشمرده شده درخصوص اسانس گل میخک و با توجه به نقش نانو ذرات در افزایش قابلیت نفوذ و پخش دارو در پستانداران می‌توان انتظار داشت بارگذاری اسانس گل میخک روی نانو ذرات علاوه بر ارتقاء قدرت عملکرد این بیهوش‌کننده و کاهش اثرات جانبی آن افقی تازه در استفاده از نانو داروها در ماهیان بعنوان حیوانات آزمایشگاهی باشد.

مواد و روش کار

تعداد ۵۰ ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ۲ ساله نر و ماده با میانگین (± انحراف معیار) وزنی ۲۴±۱۵۵/۸ و میانگین (± انحراف معیار) طول ۲±۲۳/۷ بصورت تصادفی از مزرعه‌ای در شهر بنجار واقع در ۶/۵ کیلومتری جنوب شرقی شهرستان زابل با مختصات جغرافیایی ۳۱ درجه طولی و ۶۱ درجه عرضی صید و به سالن مدار بسته پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون دانشگاه زابل منتقل گردید. ماهیان به منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به مدت یک هفته در تانکهای ۳۰۰ لیتری حاوی ۲۵۰ لیتر آب نگهداری شدند. نور سالن نور طبیعی شبانه‌روز بود. در طول مدت سازگاری و انجام آزمایش فاکتورهای فیزیکی و شمیایی آب شامل درجه حرارت، pH، نیتریت، آمونیاک و دی اکسید کربن اندازه‌گیری و ثبت گردید. به منظور تامین اکسیژن در حد اشباع هوادهی توسط پمپ هواده و سنگ هوا صورت گرفت. در مدت سازگاری و انجام آزمایش ماهیان تغذیه نمی‌شدند، همچنین تانکها روزانه سیفون می‌شدند و ۲۰ درصد آب آنها با آب تانک ذخیره تعویض می‌گردید.

اسانس گل میخک (حاوی حداقل ۸۰ درصد یوگنول) از غنچه‌های خشک شده درخت میخک (*Eugenia cairyophillata*) توسط پژوهشکده گیاهان دارویی تهیه و به منظور جلوگیری از تنزل نوری (Photodegradation) در ظرف تیره و در بسته و در دمای ۱۹ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه شیمی تجزیه دانشگاه زابل منتقل گردید. نانو ذرات آهن با استفاده از فرآیند ته‌نشینی شیمیایی تهیه شدند برای این منظور مخلوطی از کلرید آهن سه ظرفیتی، کلرید آهن دو ظرفیتی و

اسید هیدروکلریک در آب مقطر حل شدند. سپس مخلوط حاصل بصورت قطره قطره به محلول NaOH اضافه و به شدت هم زده شد. پس از انجام واکنش، نانو ذرات ته‌نشین شده بوسیله میدان مغناطیسی از مخلوط جدا شدند و پس از شستشو با آب مقطر در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به کمک آون خشک شدند. نانو ذرات بدست آمده به نسبت یک به ۳ با اسانس گل میخک مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک هم زده شدند.

تعداد ۵۰ ماهی بصورت تصادفی در ۵ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند و به تانکهای جداگانه منتقل شدند و با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ ppm اسانس گل میخک بار شده بر نانو ذرات آهن به شیوه حمام بیهوش شدند. بیهوشی در آکواریوم ۶۰ لیتری محتوی ۳۰ لیتر محلول بیهوشی که از ترکیب آب و ماده بیهوشی در غلظت‌های ذکر شده بدست آمده بود، صورت گرفت. پس از انتقال هر یک از ماهیان به آکواریوم حاوی ماده بیهوشی زمانهای رسیدن به مراحل تسکین، از دست رفتن تعادل و بیهوشی سبک با دقت صدم ثانیه توسط کرنومتر ثبت شد (جدول ۱).

با رسیدن ماهی به مرحله بیهوشی سبک ماهیان بیهوش شده برای بازگشت از بیهوشی با استفاده از ساچوک به آکواریومی دیگر حاوی ۵۰ لیتر آب فاقد ماده بیهوشی که به خوبی هوادهی می‌شد منتقل شدند و زمانهای مربوط به مراحل مختلف بازگشت از بیهوشی شامل مراحل بازگشت تعادل و احیاء کامل به دقت ثبت گردید. ماهیان احیاء شده به مدت ۹۶ ساعت برای رویت هر نوع اثر سوء ناشی از بیهوشی مانند شنای غیرطبیعی و مرگ و میر به دقت تحت نظر قرار گرفتند.

برای انجام محاسبات، آنالیزهای آماری و ترسیم نمودارها از نرم‌افزارهای Excell 2003 و SPSS14 استفاده شد.

جدول ۱: خلاصه طبقه‌بندی مراحل مختلف بیهوشی در ماهیان (Keene *et al.*, 1998)

مرحله	رفتار ماهی
تسکین	کاهش تعداد تنفس، تعادل عادی، عدم پاسخ به محرک های خارجی دیداری و شنیداری
از دست رفتن تعادل	فقدان کامل تعادل، افزایش موقتی تعداد تنفس، واکنش پذیر نسبت به محرک های لمسی قوی
بیهوشی سبک	از دست رفتن کامل تونیسیته عضلات، عدم پاسخ گویی به محرک های خارجی، ضربان قلب آهسته
بیهوشی جراحی	از دست رفتن کامل پاسخگویی به محرک ها، تعداد تنفس بسیار کم، ضربان قلب بسیار آهسته
مرگ	توقف کامل حرکت سرپوش آبششی، ایست قلبی بعد از چند دقیقه
بازگشت تعادل	بازگشت کامل تعادل، افزایش تعداد تنفس
احیا کامل	شنا عادی، واکنش پذیر نسبت به انواع محرک های خارجی

نتایج

اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شمیایی آب در طول مدت سازگاری و انجام آزمایش تغییرات بسیار ناچیزی را نشان داد و فاکتورهای مذکور در حد توصیه شده بودند. نتایج بدست آمده از بیهوشی ماهی قزل آلای رنگین کمان در غلظت‌های مختلف اسانس گل میخک بارگذاری شده روی نانو ذرات آهن و پارامترهای زمانی مختلف شامل: مدت زمان لازم برای ایجاد تسکین در ماهی، مدت زمان لازم برای از دست رفتن تعادل ماهی، مدت زمان لازم برای ایجاد بیهوشی سبک در ماهی، مدت زمان لازم برای بازگشت تعادل ماهی و مدت زمان لازم برای احیاء کامل ماهی در جدول ۲ آمده است.

با توجه به نتایج بدست آمده (جدول ۲) کمترین غلظت برای ایجاد بیهوشی در قزل آلای رنگین کمان ۱۰ ppm بود که بطور میانگین طی مدت زمان ۱۲۹/۸ ثانیه موجبات بیهوشی ماهی را فراهم کرد و همچنین زمان لازم برای بازگشت واکنش پذیری ماهی نسبت به محرک‌های خارجی در این مقدار ۲۷۹/۱ ثانیه بود.

مشاهده رفتار ماهیان بیهوش شده تا ۹۶ ساعت پس از بیهوشی موید بی‌خطر بودن اسانس میخک بارگذاری شده روی نانو ذرات آهن در غلظت بدست آمده از این تحقیق برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد. هیچگونه اثر جانبی شامل تغییرات ظاهری، تغییر رنگ، تغییرات رفتاری مشکلات شنا و تنفسی مشاهده نشد. همچنین در طول مدت مذکور هیچ گونه تلفاتی در ماهیان رخ نداد.

جدول ۲: میانگین (± انحراف معیار) زمانهای رسیدن به مراحل مختلف بیهوشی و بازگشت از آن در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تحت تاثیر اسانس گل میخک بارگذاری شده روی نانو ذرات آهن

گروه‌ها / مراحل	بیهوش شده با غلظت ۱۰۰ppm	بیهوش شده با غلظت ۷۵ppm	بیهوش شده با غلظت ۵۰ppm	بیهوش شده با غلظت ۲۵ppm	بیهوش شده با غلظت ۱۰ppm
زمان ایجاد تسکین (ثانیه)	۲۳/۱±۱۵/۰(۱۰*)e**	۲۶/۸±۶/۰(۱۰)d	۳٤/٤±۱۸/۰(۱۰)c	٤۸/۰±۸/۹(۱۰)b	۵۹/۲±۷/۲(۱۰)a
زمان از دست رفتن تعادل (ثانیه)	۲۹/۲±۱/۹(۱۰)c	۳٦/۳±۲/۸(۱۰)c	۵٦/۰±۱٦/٤(۱۰)b	٦۵/۸±۵/٤(۱۰)b	۸۱/۷±۱۰/۲(۱۰)a
زمان القا بیهوشی سبک (ثانیه)	٤۲/۷±٤/۱(۱۰)d	۵۳/۹±۳/۷(۱۰)d	۸۸/۵±۲۲/۰(۱۰)c	۱۰۳/٤±۱۲/٦(۱۰)b	۱۲۹/۸±۷/۷(۱۰)a
زمان بازگشت تعادل (ثانیه)	۱۳٦/۸±۱۷/٤(۱۰*)a	۱۱۸/۹±۱۱/٤(۱۰)ab	۱۰٤/۲±۲۳/۸(۱۰)b	۹۹/۵±۱۲/۰(۱۰)b	۹۹/٦±۳/۱(۱۰)b
زمان احیا کامل (ثانیه)	۳۳۹/۱±۲۳/۰(۱۰)a	۳۳٦/٤±۲۱/۵(۱۰)a	۳۲٦/٦±٦۳/٤(۱۰)ab	۳۲۳/۸±۳۰/۰(۱۰)ab	۲۷۹/۱±٤۵/۷(۱۰)b

*** اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده تعداد ماهی مورد بررسی قرار گرفته است.**

**** حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده اختلاف معنی دار (P<۰/۰۵) بین گروه‌هاست.**

بحث

داروررسانی کنترل شده در بدن از مقوله‌های بسیار مهم در صنعت دارو سازی بشمار می‌رود. با روشهای معمول مصرف دارو، دارو در سراسر بدن توزیع خواهد شد و تمام بدن تحت اثرات آن قرار خواهد گرفت و عوارض جانبی احتمالی دارو بروز خواهد کرد. بنابراین در روش‌های معمول مصرف دارو برای دستیابی به یک اثر خاص نیاز به مصرف مقادیر بیشتری از دارو است. اما با فناوری نانو می‌توان به داروررسانی هدفمند دست یافت و زمان، مکان و سرعت آزادسازی دارو را کنترل نمود. سیستمهای داروررسانی جدید عوارض جانبی کمتر و کارایی بیشتر را به دنبال خواهند داشت (معتکف کاظمی، ۱۳۸۸).

در جدول ۳ بترتیب مقادیر بکار گرفته شده داروهای بیهوشی مبتنی بر یوگنول و سایر داروهای بیهوش کننده ماهی توسط محققین مختلف آورده شده است. کمترین غلظت بکار گرفته شده داروهای مبتنی بر یوگنول در تحقیقات صورت گرفته روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مربوط به ماده ایزوبوگنول و به میزان ۱۴ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. این ماده برای اولین بار توسط محققین نیوزلندی تهیه شد و به شکل گسترده توسط محققین آمریکایی بکار گرفته شده است و تقریباً حالتی انحصاری دارد (Ross & Ross, 2008) که صرفاً برای ایجاد مرحله تسکین بکار گرفته شده است (Meinertz *et al.*, 2006). از سوی دیگر مقایسه غلظت‌های بکارگرفته شده اسانس گل میخک توسط سایر محققین با نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد بارگذاری اسانس گل میخک روی نانو ذرات می‌تواند بین ۲ تا ۲۵ برابر قدرت بیهوش‌کنندگی اسانس گل میخک را

افزایش دهد، در مورد سایر ترکیبات مشتق شده از یوگنول مثل ایزویوگنول هم این قدرت بین ۱/۴ تا ۷/۵ برابر ارتقاء خواهد یافت.

همچنین در مقایسه غلظت‌های توصیه شده برای داروی پرکاربردی مثل $MS_{۲۲۲}$ با غلظت بکار گرفته شده در این تحقیق می‌توان دریافت اسانس گل میخک بارگذاری شده ۵ تا ۱۰ برابر قدرتمندتر از $MS_{۲۲۲}$ عمل می‌کند. این در حالی است که $MS_{۲۲۲}$ با وجود کاربرد فراوان در بسیاری از مزارع تکثیر و پرورش دنیا، دارای محدودیت‌هایی از قبیل مدت زمانی است که سازمان غذا و داروی ایالات متحده امریکا (USFDA) برای خروج کامل این ماده از بدن ماهی تعیین کرده که ۲۱ روز بطول می‌انجامد (Ross & Ross, 2008)، در حالی که ترکیبات یوگنول و مشتقات آن به سرعت از خون و بافت‌های ماهی خارج می‌شوند (Fischer *et al.*, 1990) موضوع دیگر قیمت بالاتر $MS_{۲۲۲}$ نسبت به ترکیبات حاوی یوگنول است (Keene *et al.*, 1998).

در تحقیق حاضر در تمام غلظت‌های بکار گرفته شده اسانس گل میخک بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن، زمان القا بیهوشی کمتر از ۳ دقیقه و مدت زمان لازم برای احیا کامل ماهی ۴ تا ۶ و بطور میانگین ۵ دقیقه بود. با توجه به اینکه توصیه شده است ماده بیهوش‌کننده مطلوب برای ماهیان بایستی بترتیب زمانهای القا و احیا کامل ۳ و ۵ دقیقه را داشته باشد (Marking & Meyer, 1985) غلظت‌های بکار گرفته شده در این مطالعه همگی معیارهای لازم برای یک بیهوش کننده مناسب را به نمایش گذاشتند. بنابراین می‌توان اسانس گل میخک بارگذاری شده بر نانو ذرات آهن را یک بیهوش‌کننده مناسب برای ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان بشمار آورد. با توجه به اینکه مقدار موثر بیهوش‌کننده غلظتی است که کوتاهترین القا و سریعترین احیا را داشته باشد (Keene *et al.*, 1988) و با در نظر گرفتن صرفه اقتصادی، غلظت ppm ۱۰ مقدار موثر این دارو تشخیص داده شد. ضمن اینکه در غلظت‌های بالاتر زمان بازگشت از بیهوشی افزایش یافته که در مواردی که تعداد ماهیانی که قصد بیهوش کردن آنها را داریم زیاد باشند و امکانات محدود، می‌تواند ایجاد مشکل نماید و عملیات تکثیر یا پرورش را دچار وقفه نماید که ممکن است خسارات اقتصادی بدنبال داشته باشد (Woody *et al.*, 2002).

با توجه به این نکته که اطلاعات درباره اثرات اسانس گل میخک روی فیزیولوژی ماهیان هنوز خیلی محدود است و ممکن است برای برخی مطالعات مفید نباشد (Anderson *et al.*, 1997)، لذا منطقی بنظر می‌رسد حتی‌الامکان از غلظت‌های کمتر این ماده استفاده کرد.

با توجه به موثر بودن بارگذاری اسانس گل میخک روی نانو ذرات آهن، یکی از راه های کاستن از غلظت مورد نیاز این ماده می‌تواند کمک گرفتن از فناوری نانو باشد. از سوی دیگر با توجه به گران بودن داروهایی مانند $MS_{۲۲۲}$ (۱/۵ برابر گرانتر از اسانس گل میخک (Erdmann, 1999) و وارداتی بودن آنها تولید دارویی که بتواند ماهی را به صورت کارا، قابل پیش‌بینی و ایمن بیهوش نماید (Sladky *et al.*, 2001) و در عین حال قیمت مناسبی داشته باشد ضروری به نظر می‌رسد. دستیابی به چنین هدفی علاوه بر تامین نیازهای داخلی کشور می‌تواند برای کشور ارزآوری داشته باشد. لازمه این کار تحقیقات مستمر در زمینه بکارگیری فناوری‌های نوین در امر دارو رسانی در آبزیان و بومی سازی این فناوری‌ها می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مدیریت و پرسنل پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون دانشگاه زابل بخصوص دکتر احمد قرایی مدیر گروه شیلات پژوهشکده بدلیل تامین بخشی از هزینه‌های این تحقیق و همکاری و مساعدت در مراحل مختلف انجام آن تشکر بعمل می‌آید. همچنین از زحمات و کمکهای سرکار خانم افسانه برخوردار کارشناس دانشکده علوم دانشگاه زابل، مهندس عبدالعلی راهداری و مهندس فدایی کارشناسان اداره کل شیلات سیستان و مهندس بشیر آقاجانی شیرکوهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

جدول ۳: غلظت بکار گرفته شده داروهای مختلف بیهوشی توسط محققین مختلف روی ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان

ماده بیهوشی	غلظت (ppm)	منبع
اسانس گل میخک	۱۰۰	چیت ساز، ۱۳۷۹
	۲۵۰-۱۰۰	سلطانی و همکاران، ۱۳۸۰
	۱۲۰-۳۳	Soto & Burhanuddin, 1995
	٤٠-٢٠	Anderson *et al.,* 1997
	٦٠-٤٠	Keene *et al.,* 1998
	٤٠	Griffiths, 2000
	۳۰	Prince & Powell, 2000
	۲۵-۱۰۰	Woolsey *et al.,* 2004
	۳۳	Velisek *et al.,* 2005
	۲۵	Cotter & Rodinick, 2006
ایزواوژنول	۷۵	Stehly & Ginerid, 1999
	٤٠	Wagner *et al.,* 2002
	٣٤-١٤	Meinrtz *et al.,* 2006
$MS_{۲۲۲}$	۸۰	Wedmeyer *et al.,* 1969
	۱۰۰	Soivio *et el.,* 1977
	٦٠	Wagner *et al.,* 2002
	۸۰	Pirhonen & Schreck, 2003
	٦٠	Cotter & Rodinick, 2006
	۵۰	Cammano Tubio *et el.,* 2010

منابع

ابطحی، ب.؛ شریف‌پور، ع.؛ آقاجانپور، م.؛ رسولی، ع.؛ فقیه‌زاده، س.؛ امید بیگی، ر. و نظری، ر.م.، ۱۳۸۱. مقایسه LC_{50}. اسانس گل میخک و MS_{222} در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی، قزل‌آلای‌رنگین‌کمان و کپور معمولی. مجله علمی شیلات ایران، سال یازدهم، صفحات ۱ تا ۱۲.

دوستگانی، الف.؛ واشقانی فراهانی، الف. و ایمانی، م.، ۱۳۸۶. تعیین شرایط بهینه تهیه نانو ذرات از پلیمر طبیعی کیتوسان. مجله علوم و تکنولوژی پلیمر، شماره ۵، صفحات ۴۵۷ تا ۴۶۴.

رفیعی‌تبار، ه.، ۱۳۸۴. فناوری نانو و کاربردهای آن در پزشکی و داروسازی. مجله پژوهش در پزشکی، شماره ۲، صفحات: ۱۱۱تا ۱۱۵.

سلطانی، م.؛ امید بیگی، ر.؛ رضوانی، س.؛ مهرابی، م.ر. و چیت‌ساز، ح.، ۱۳۸۰. مطالعه اثرات هوشبری اسانس و عصاره گل میخک در ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان تحت برخی شرایط کیفی آب. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، سال ۵۶، شماره ۴، صفحات ۸۵ تا ۸۹.

سلطانی، م.؛ غفاری، م.؛ خضرائی‌نیا، پ. و بکایی، س.، ۱۳۸۳. مطالعه اثرات بیهوشی اسانس گل میخک هندی بر پارامترهای هماتولوژیک، برخی آنزیمهای خون و آسیب شناسی بافتهای مختلف ماهی کپور معمولی. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، سال ۵۹، شماره ۳، صفحات ۲۹۵ تا ۲۹۹.

شریف‌پور، ع.؛ سلطانی، م.؛ عبدالحی، ح. و قیومی، ر.، ۱۳۸۱. اثر بیهوش‌کنندگی اسانس گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) در شرایط مختلف pH و درجه حرارت در بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، شماره ۴، صفحات ۵۹ تا ۷۴.

شریف‌روحانی، م.؛ حقیقی، م.؛ عصائیان، ح. و لشتو آقایی، غ.ر.، ۱۳۸۶. بررسی اثر بیهوشی اسانس آویشن شیرازی *Zataria multiflora* Boiss. (Labiatae) بر ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، شماره ۴، صفحات ۹۹ تا ۱۰۶.

معتکف کاظمی، ن.، ۱۳۸۸. نانو حامل‌ها در سیستمهای دارورسانی. ماهنامه فناوری نانو، شماره ۱۴۸، صفحات ۳۸ تا ۴۱.

Anderson W.G., McKinley R.S. and Colavecchia M., 1997. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. North American Journal Fishery Management, 17:301–307.

Cammano Tubio R.I., Weber R.A. and Aldegunde M., 2010. Home tank anesthesia: A very efficient method of attenuating handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal Applied Ichthyology, 26: 116–117.

Cotter P.A. and K.J. Rodnick, 2006. Differential effects of anesthetics on electrical properties of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. Comparative Biochemistry Physiology A., 145: 158-165.

Erdmann M.V., 1999. Clove oil: An 'eco-friendly' alternative to cyanide use in the live reef fish industry? SPC Live Reef fish Bulletin, 5:4–7.

Fischer I.U., Von Unruh G.E. and Dengler H.J., 1990. The metabolism of eugenol in man. Xenobiotica, 20:209–222.

Griffiths S.P., 2000. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. Journal of Fish Biology, 57: 1453-1464.

Guénette S.A.; Uhland F.C.; Hélie P.; Beaudry F. and Vachon P., 2007. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 266:262–265.

Hilton J.W. and Dixon D.G., 1982. Effect of increased liver glycogen and liver weight on liver function in rainbow trout, *Salmo*

gairdneri Richardson: Recovery from anaesthesia and plasma 35 *S*-sulphobromo-pthalein clearance. Journal of Fish Disease, 5(3):185–195.

Kazun K. and Siwicki A.K., 2001. Propiscin – a safe new anaesthetic for fish. Archives of Polish Fisheries, 9:183–190.

Keene J.L., Noakes D.L.G., Moccia R.D. and Soto C.G., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhyncus mykiss* (Walbaum). Aquatic Research, 29:89–101.

Kikuchi T., Sekizawa Y. and Ikeda Y., 1974. Behavioral analyses of the central nervous system depressant activity of 2-amino-4-phenythiazole upon fishes. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries, 40(4): 325–337.

Marking L.L. and Meyer F.P., 1985. Are better fish anaesthects needed in fisheries? Fisheries, 10:2–5.

Meinertz J.R., Greseth S.L., Schreier T.M., Bernardy J.A. and Gingerich W.H. 2006. Isoeugenol concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin-on fillet tissue after exposure to AQUI-S$^{(TM)}$ at different temperatures, durations, and concentrations. Aquaculture, 254: 347–354.

Pirhonen J. and Schreck C.B., 2003. Effects of anaesthesia with MS-$_{222}$, clove oil and CO_2 on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 220:507–514.

Prince A. and Powell C., 2000. Clove oil as an anaesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. North American Journal of Fisheries Management, 20:1029.1032.

Ross L.G. and Ross B., 2008. Anaesthesia and sedation of aquatic animals. Third Edition, Wiley-Blackwell. ISBN: 978-1-4051-4938-9.

Siwicki A., 1984. New anaesthetic for fish. Aquaculture, 38:171–176.

Sladky K., Swanson C., Stoskopf M., Loomis M. and Lewbart G., 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetic in red pacu (*Piaractus brachypomus*). American Journal of Veterinary Research, 62(3): 337-342.

Soivio A., Nyholm K. and Huhti M., 1977. Effects of anaesthesia with MS_{222}, neutralized MS_{222} and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, Journal of Fish Biology, 10:91–101.

Soto, C.G. and Burhanuddin, 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). Aquaculture, 136:149–152.

Stehly G.R. and Gingerich W.H., 1999. Evaluation of AQUI-S™ (efficacy and minimum toxic concentration) as a fish anaesthetic/sedative for public aquaculture in the United States. Aquaculture Research, 30:365-372.

Velisek J. and Svobodova Z., 2004. Anaesthesia of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with 2-phenoxyethanol: Acute toxicity and biochemical blood profile**.** Acta Veterinary Brno, 73:379-384.

Velisek J., Svobodova Z. and Piackova V., 2005. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Acta Veterinary Brno, 74: 139-146.

Wagner E., Arndt R. and Hilton B., 2002. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock

Woody C.A., Nelson J. and Ramstad K., 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: Field trails. Journal of Fish Biology, 60: 340.347.

Woolsey J., Holcomb M. and Ingermann R.L., 2004. Effect of temperature on clove oil anesthesia in steelhead fry. North American Journal of Aquatic, 66:35–41.

anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. Aquaculture, pp.2113–366.

Wedemeyer G., 1969. Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. Comparative Biochemistry and Physiology 29:1247–1251.